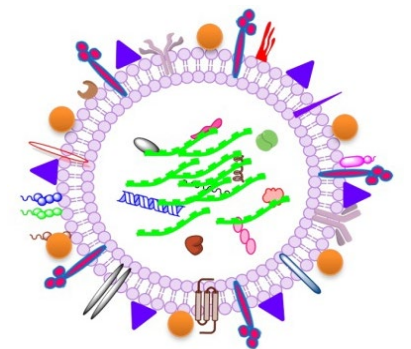


**Исследование возможности изменения
биодоступности препаратов
ассоциированием с экзосомами дрожжей
в эксперименте с опарышами**

Ученица 11 «А» класса Смирнова Анастасия

Москва, 2020 г.



Биодоступность

- **Биодоступность** — это относительное к общему введённому количеству лекарственного вещества, доходящее до места его действия в организме.
- Обычно биодоступность определяют по *количеству лекарственного вещества в крови*, то есть величине введенной дозы *неизмененного* активного вещества, которая достигла системного кровообращения, и которая является одной из важнейших фармакокинетических характеристик лекарственного средства. Определяя биодоступность некоторого лекарства, обычно характеризуют количество терапевтически активного вещества, которое достигло системного кровотока и стало доступно в месте приложения его действия. Однако, для ряда задач, например, прохождения сквозь гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) или иные тканевые барьеры, попадания в системный кровоток недостаточно для эффективного действия. И наоборот, некоторые препараты желудочно-кишечного действия (антибиотики, сорбенты, противогельминтные) нежелательны для попадания в кровоток.

Факторы, влияющие на биодоступность:

- Физическо-химические свойства (гидрофобность, диссоциация на ионы, растворимость)
- формы и динамика высвобождения активного вещества из лекарственного препарата,
- соотношение с суточными ритмами и индивидуальными ритмами целевого органа,
- взаимодействие с другими лекарственными и пищевыми веществами,
- возможность переноса через тканевой барьер.

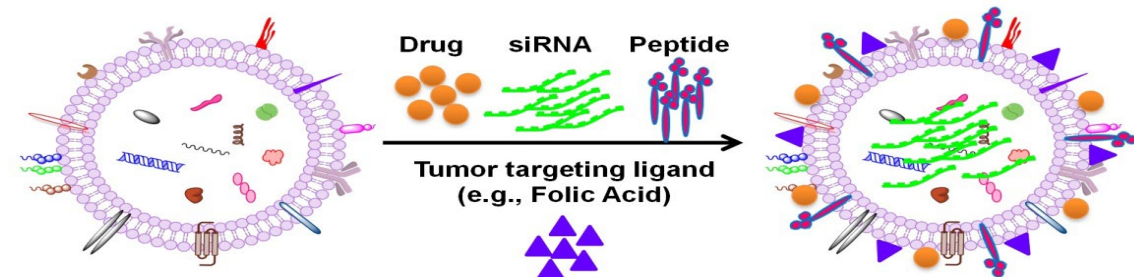
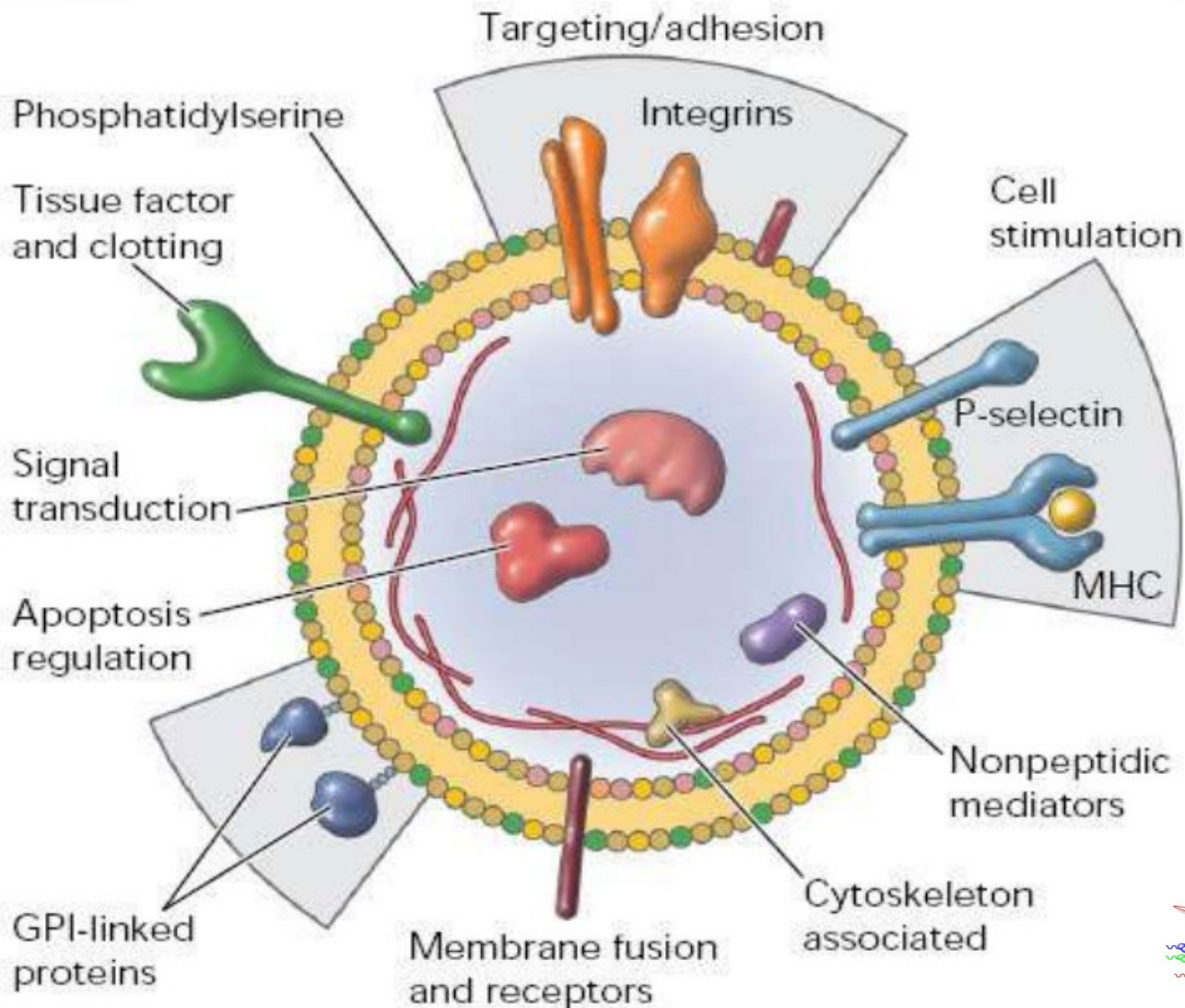
Способы модификации биодоступности

- Физический (измельчение, переосаждение на наноструктурах)
- Химический (использование веществ-предшественников с лучшей биодоступностью)
- Капсулирование в оболочки с улучшенной тропностью (например, фолиевой кислотой) и модификацией времени высвобождения
- Включение в эмульсии и липосомы (коалесценция с клеточными мембранами)
- Включение веществ или их предшественников в состав **ЭКЗОСОМ**

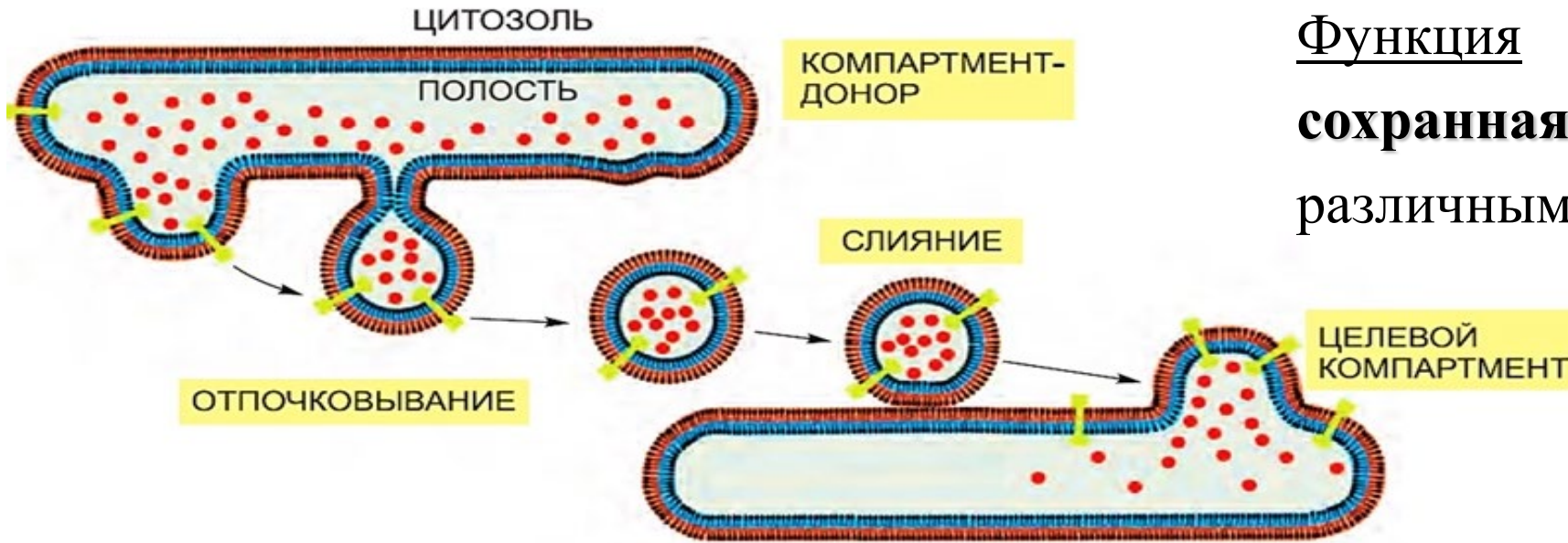
Экзосомы (или экстраклеточные везикулы) – бислойные пузырьки, производные клеточных мембран (эндосом), являющиеся универсальным механизмом межклеточного общения, эволюционно возникшим ещё у древнейших одноклеточных, характеризующиеся *адресностью*.

Экстраклеточные везикулы - ЭКЗОСОМЫ

- **Экзосомы** – тип внеклеточных везикул, производные эндосом являющихся переносчиками молекулярных сигналов в организме, несущие маркеры клеток-продуцентов.
- большинство веществ экспортируется клетками **ТОЛЬКО** в составе **ЭКЗОСОМ**.

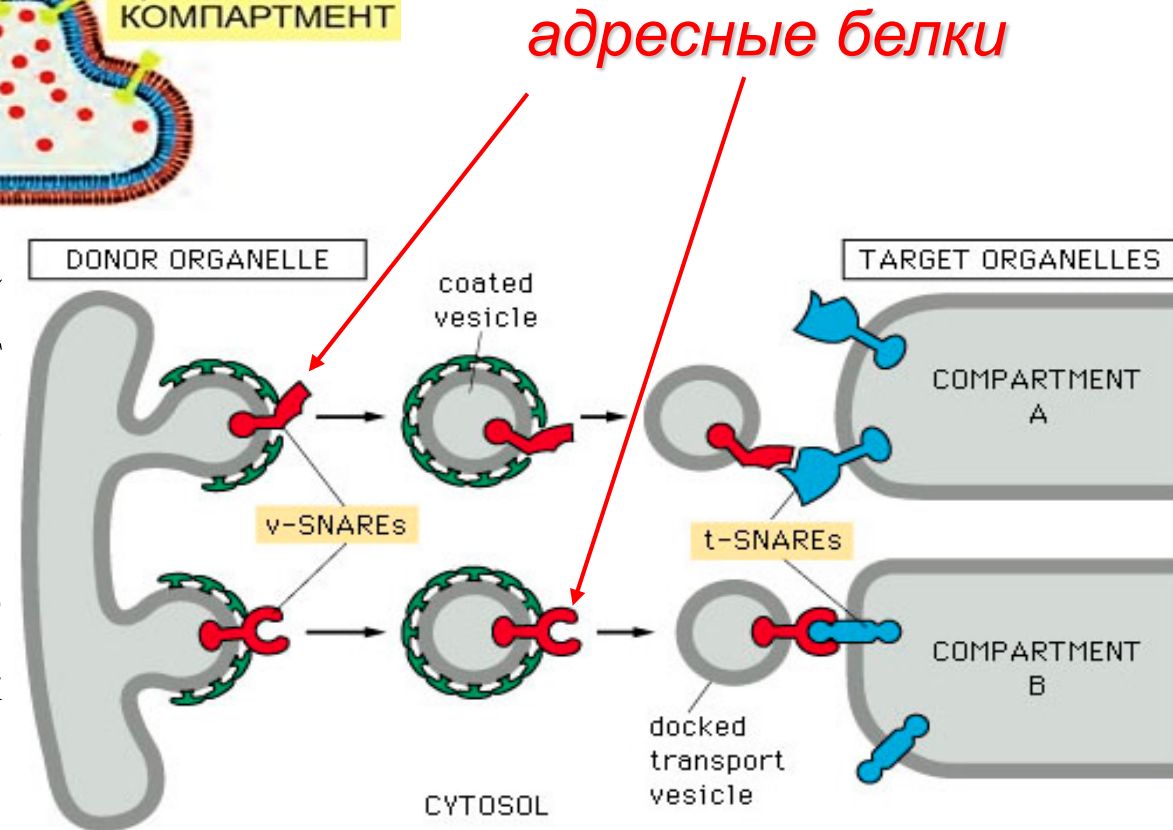


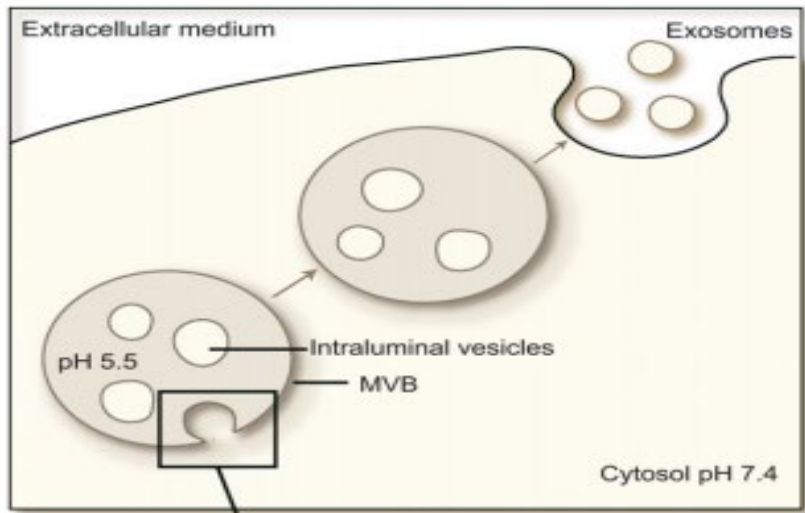
Схематичное представление везикулярного транспорта



Функция везикул — адресная **сохранная** доставка вещества между различными компартментами клеток

Схематичное представление везикулярного транспорта экзо- и эндоцитоза. Везикулы отпочковываются от одного компартмента (участка мембраны) и позже сливаются с другим. При этом они переносят вещество как груз из «люмена» (пространства внутри замкнутого мембранного отсека) одного компартмента в другой (как внутри клетки, так и между разными клетками)





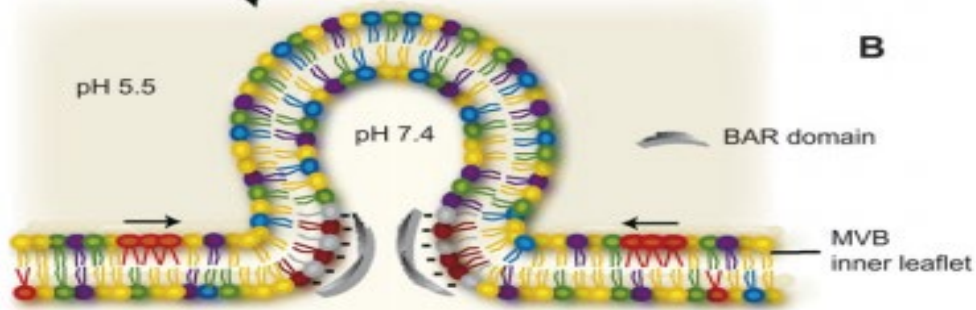
A

Формирование экзосом – нормальное свойство всех билипидных мембран живых клеток – на границе понижения рН либо изменения ионной силы сред.

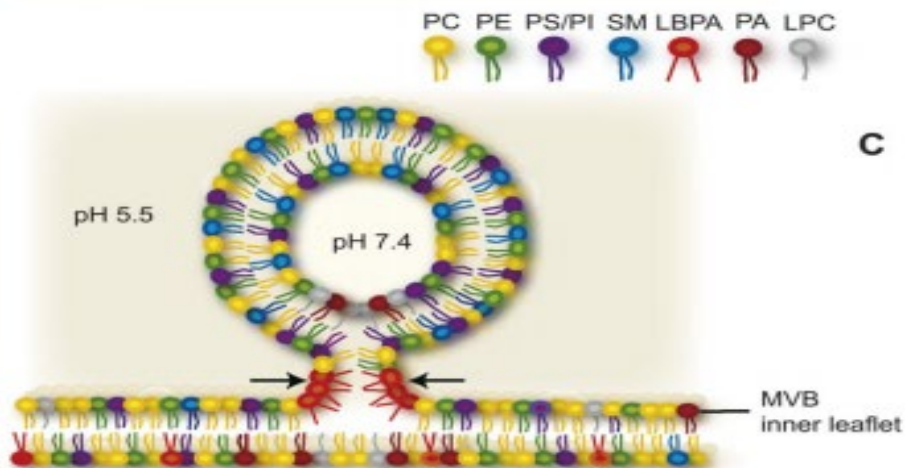
Роль липидов и рН в образовании экзосом

- Спонтанное образование везикул на биологических мембранах происходит в область с более кислой средой (меньшим рН)

- *Def:* фосфолипидная симметрия мембран Молекулы бисмоноацилглицеролфосфата (LBPA) стремятся образовать кластеры при понижении рН, - и стягивают мембрану мультивезикулярного тельца (MVB) до образования складки, а после отпочковывания везикулы остаются на донорской мембране; везикула получает «-» заряд.



B



C

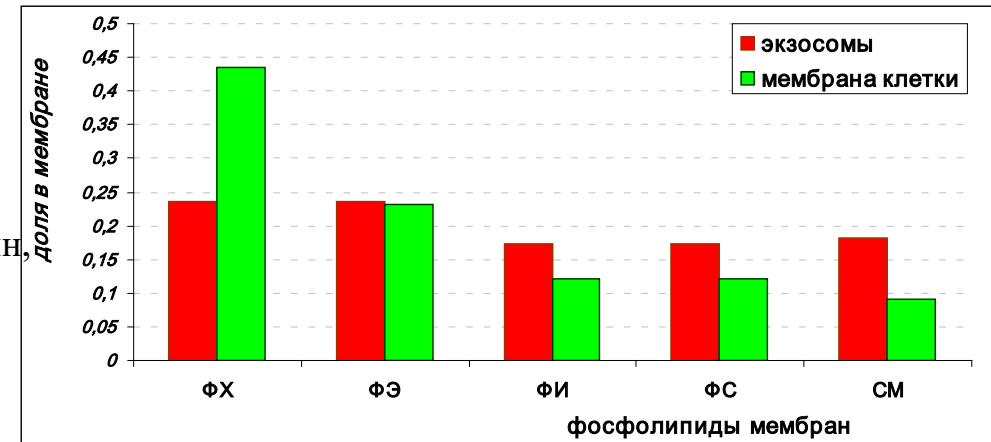
LPC=ФХ - фосфатидилхолин;

PG=ФИ – фосфатидилглицерин,

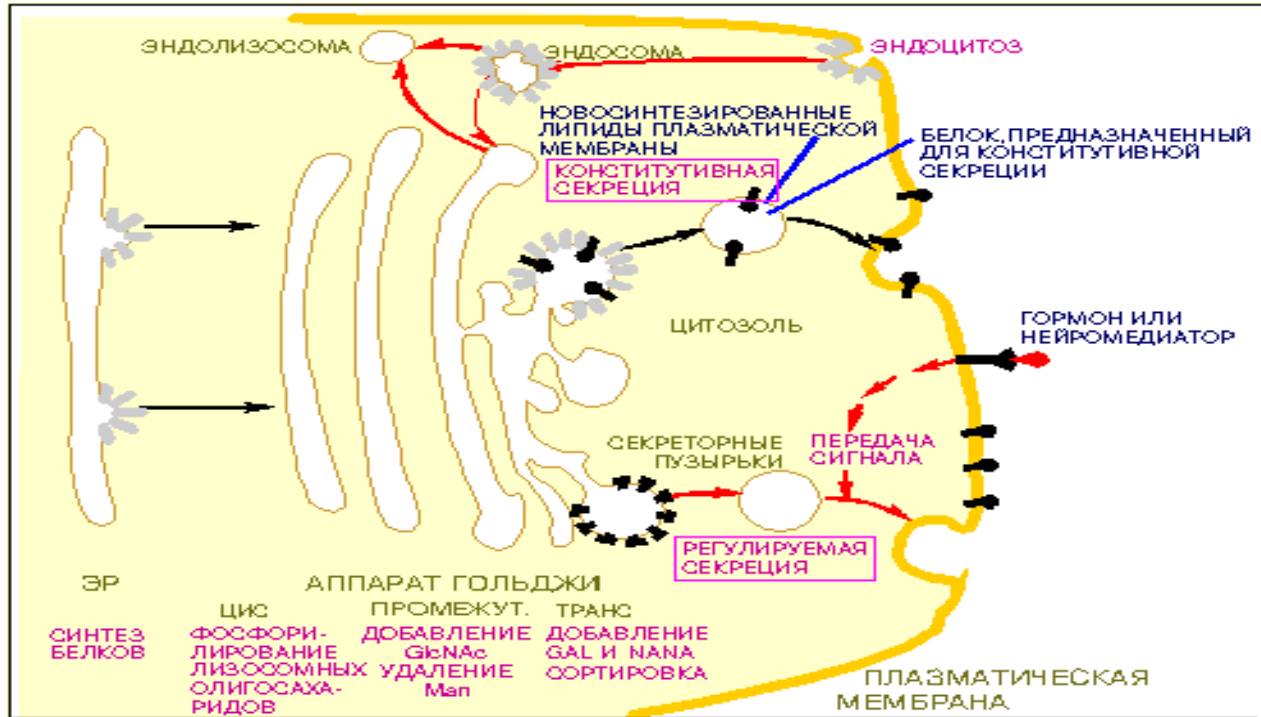
PE=ФЭ – фосфатидилэтаноламин,

PS=ФС – фосфатидилсерин,

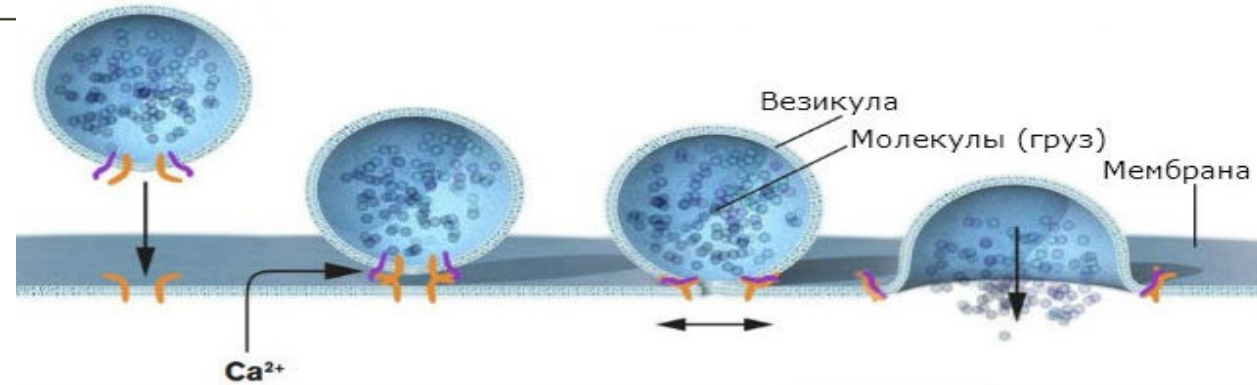
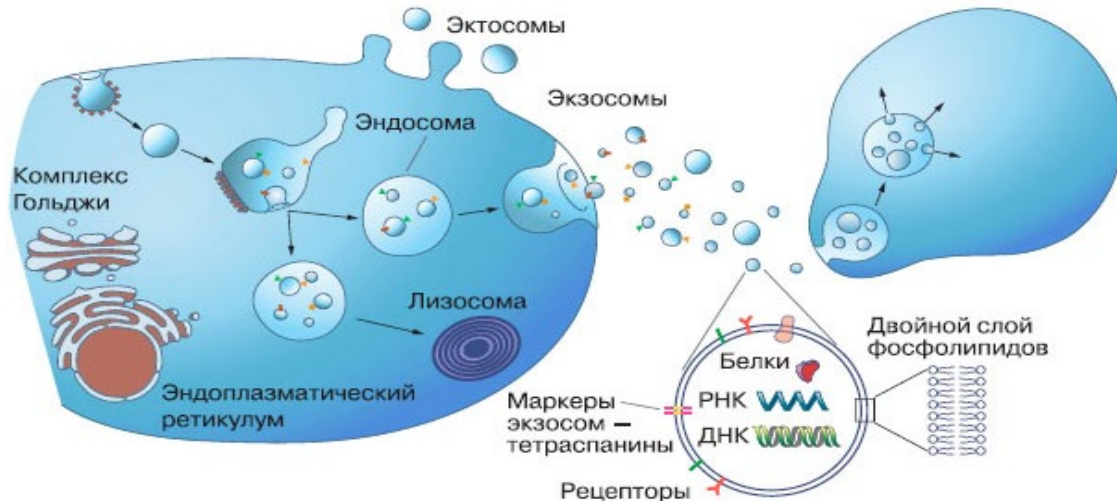
SM=СМ – сфингомиелин.



Роль экзосом в эндо- и экзоцитозе



Схематичное представление образования везикул и их транспорта (экзо- и эндоцитоза). Везикулы зарождаются в эндоплазматическом ретикулуме, формируются в комплексе Гольджи и затем «дозревают», получая специфическое окаймление белками, в эндосомах

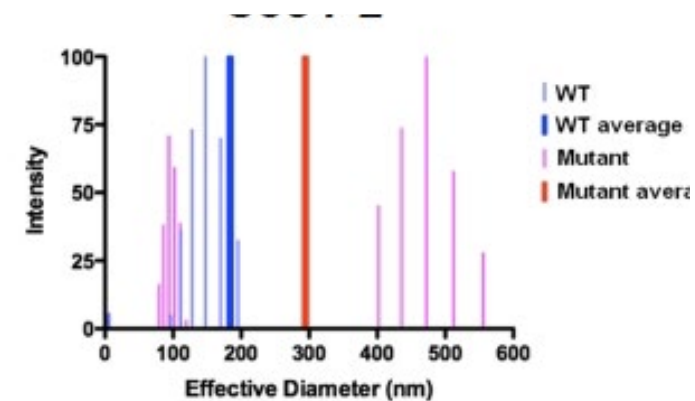
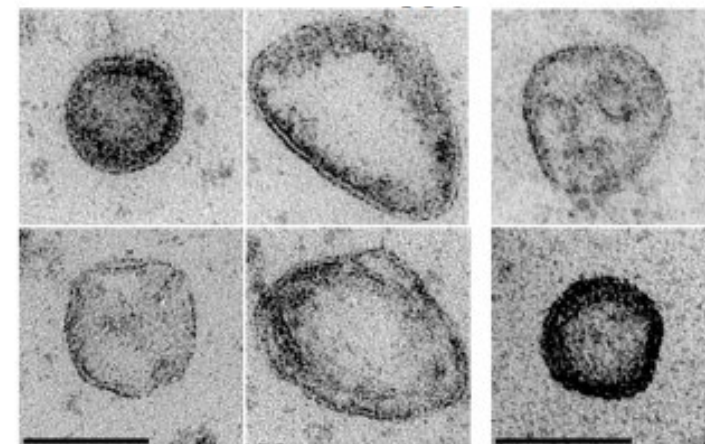


Схематичное представление эндоцитоза; роль ионов кальция в адресной доставке.

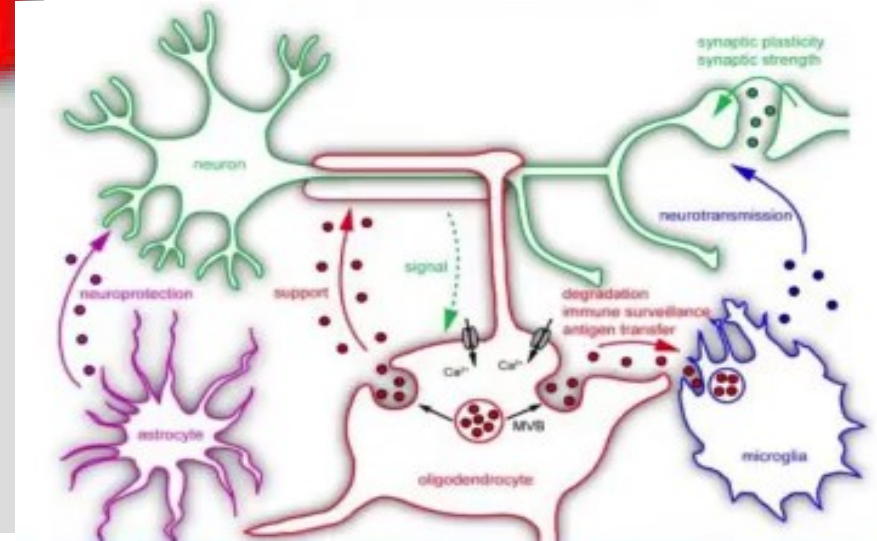
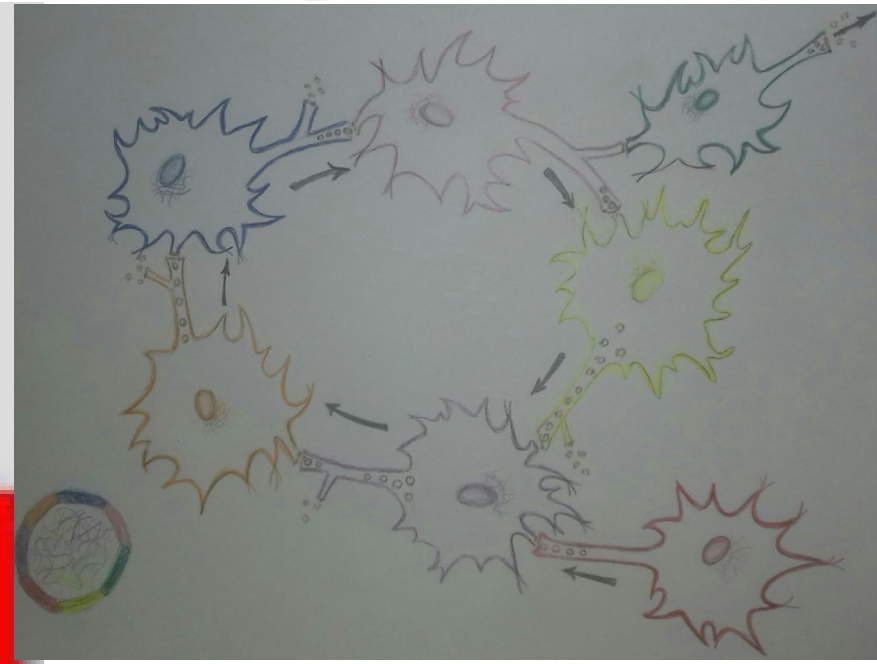
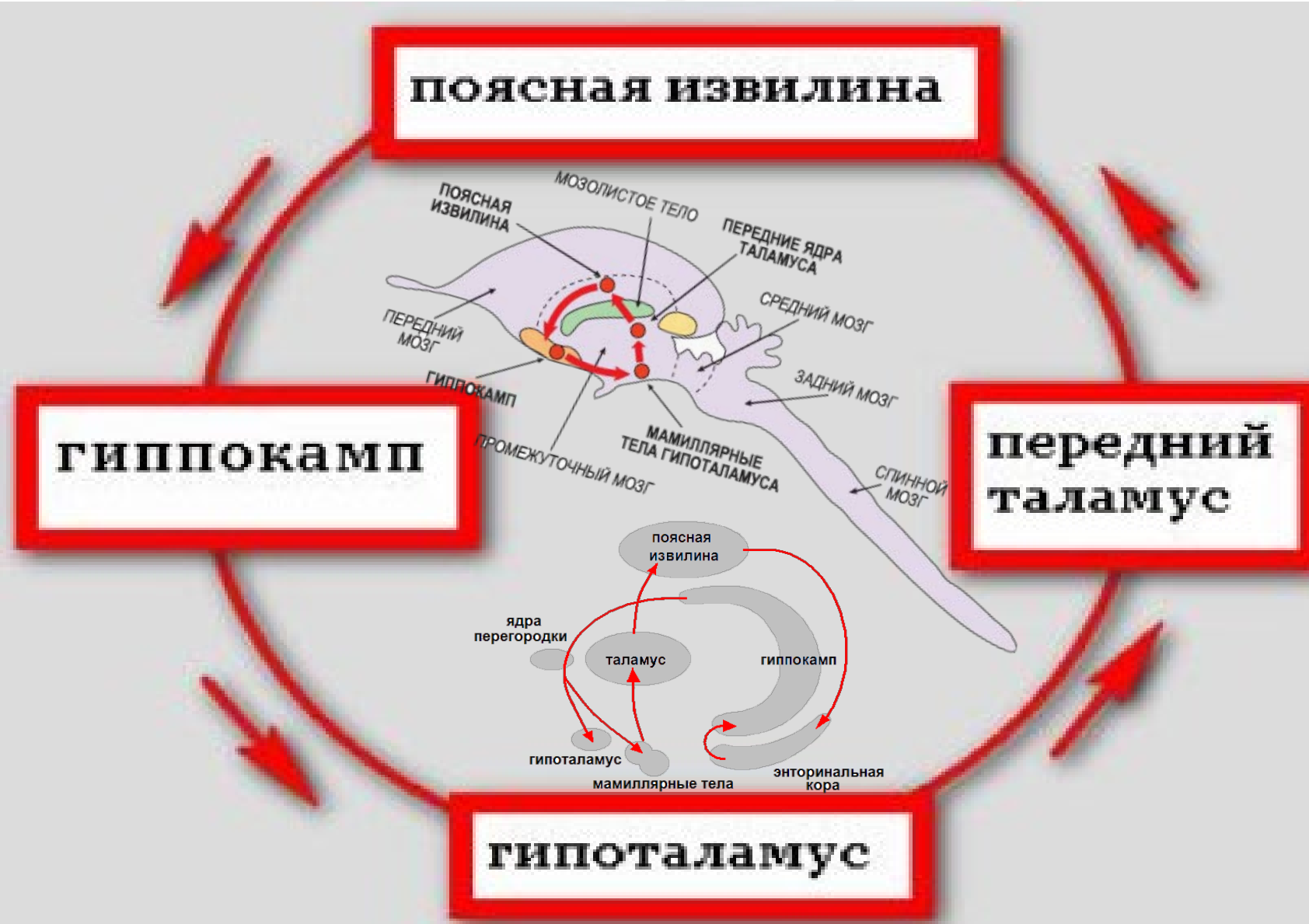
Образование экзосом клетками (просвечивающая электронная микроскопия)



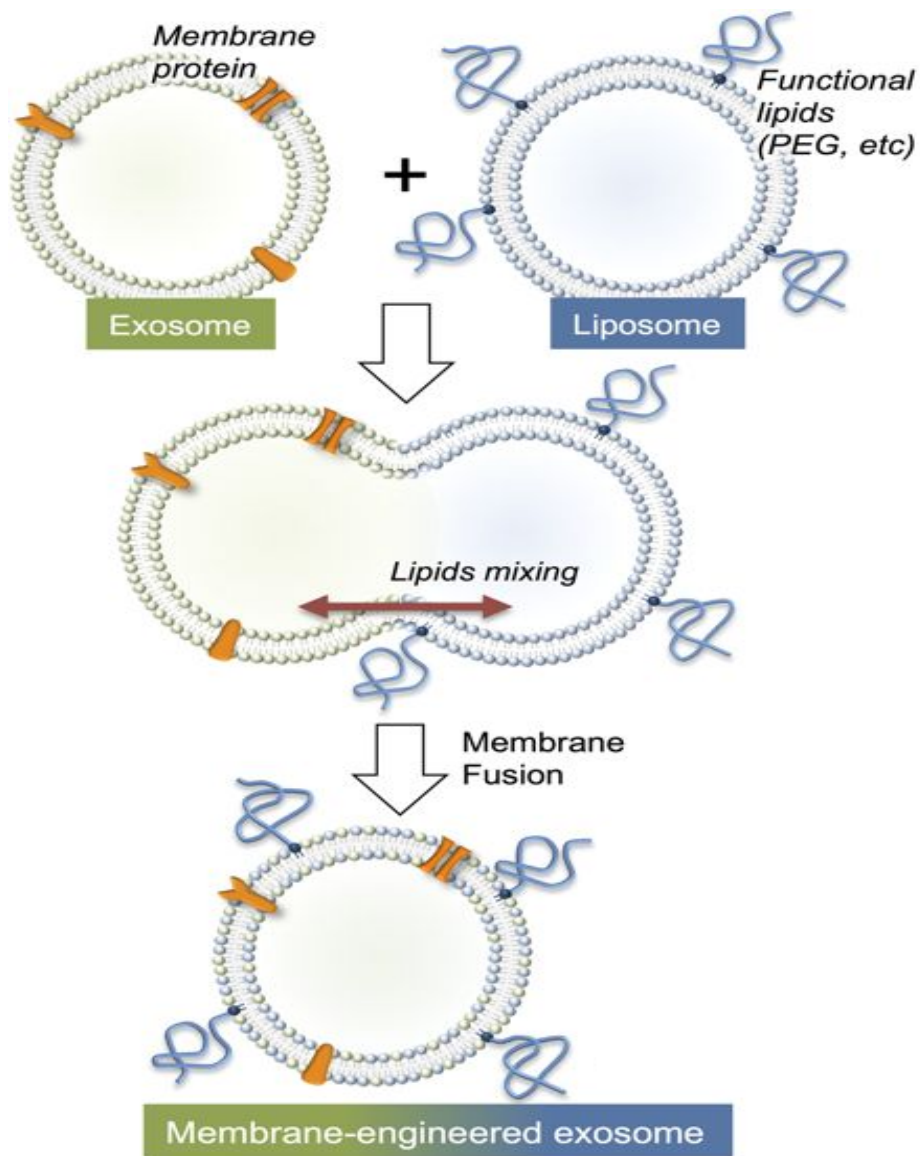
Ультратонкие срезы бактериальной культуры *B. fragilis* в момент образования везикул. Масштабный отрезок: 1 мкм.



Гипотеза формирования информационных экзосом в мозге на примере круга Пейпеца (Papez)



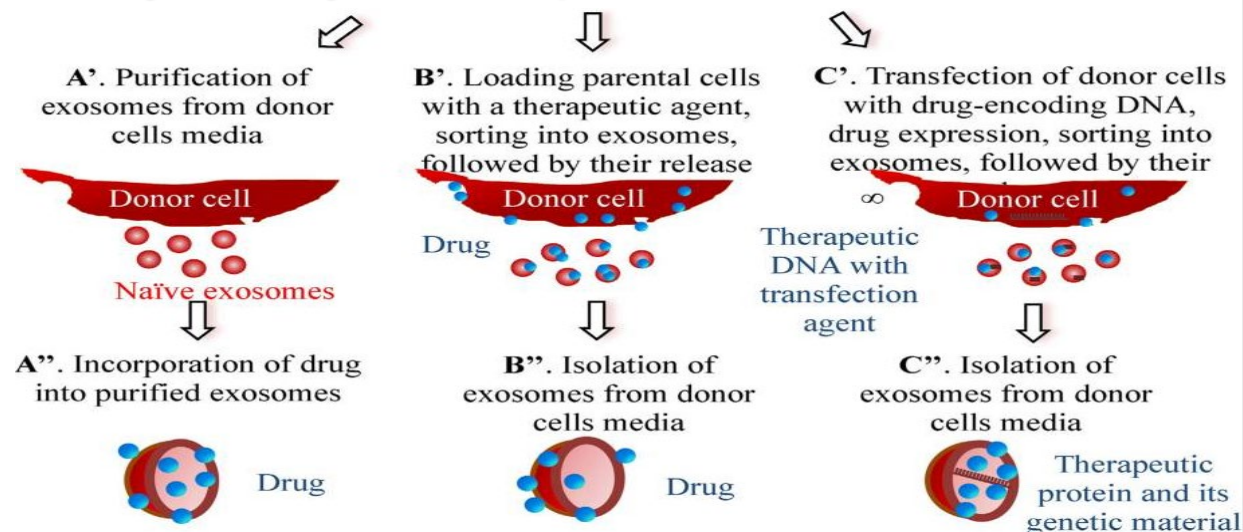
Возможные схемы использования экзосом и различные способы загрузки препарата в экзосомы клеточных культур



Способ загрузки экзосом внутренним содержимым липосом при их слиянии

Если допустить, что вещество не значительно метаболизируется дрожжевыми ферментами во время совместной инкубации и при этом ассоциируется с дрожжевыми экзосомами (адсорбцией на поверхности, коалесценцией с каплями эмульсии либо включением внутрь после поглощения клетками) без потери целевой химической активности, можно ожидать улучшения биодоступности препарата с экзосомами за счёт рецепторного узнавания общих поверхностных белков, характерных для обоих видов.

Пути получения терапевтических экзосом



Проведение экспериментов. Общая структура

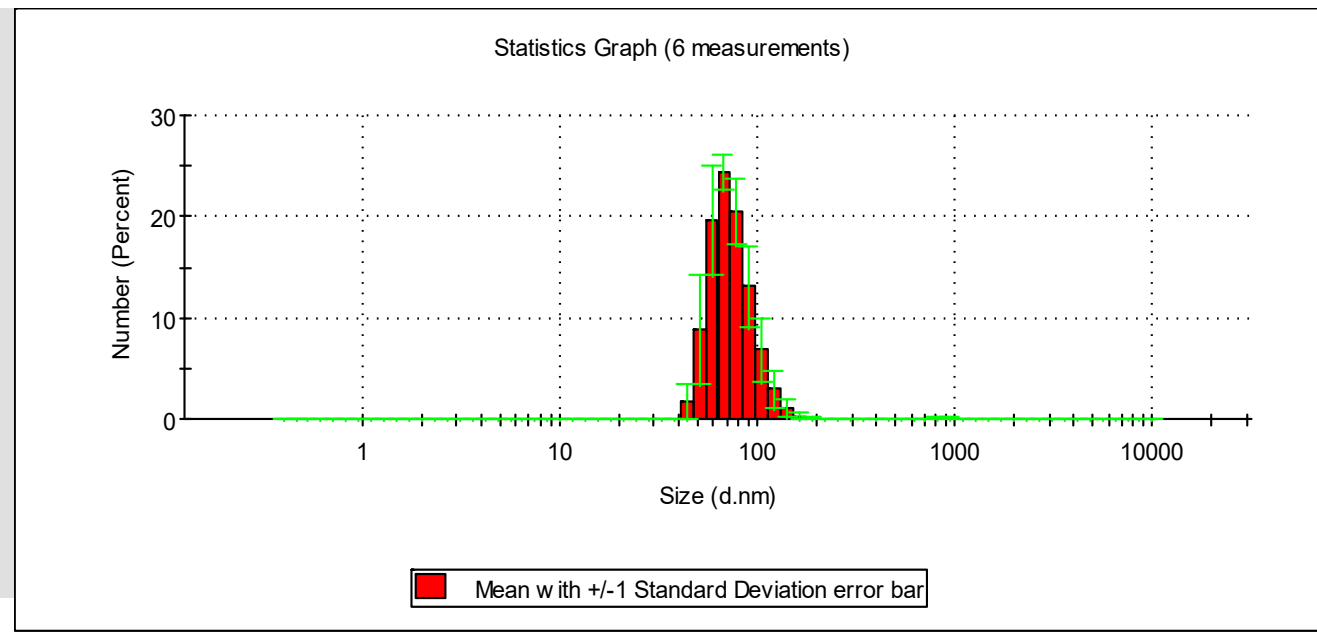
Использовалось 3 группы сравнения животных:

- 1 – негативный контроль (группа с воздействием только везикул);
- 2 – положительный контроль: препарат сравнения (праллетрин в составе жидкости «Raid»);
- 3 – **опыт** (праллетрин в ассоциации с дрожжевыми экзосомами).

Основная гипотеза: ЛВ не существенно метаболизируется дрожжами, но попадает в эндо- и экзосомы, связывается с ними.

Условия сбора экзосом:

- Вторая половина лог-фазы роста;
- Преинкубация при температуре 40°C 1-2 часа;
- Предварительное удаление клеток центрифугированием 10000g
- Отделение везикулярной фракции от остального коллоидного раствора культуральной жидкости химическим осаждением (с повышением pH) и последующим центрифугированием при 28000g



Оценка содержания экзосом в препарате

$$N = \frac{V_{vd}}{V_i} = \frac{V_{vd}}{\frac{4}{3} \pi r_i^3} = \frac{4 \cdot 10^{-3} \cdot 10^{-6} \text{ м}^3}{4,19 \cdot 10^{-21} \text{ м}^3} \approx 10^{12}$$

При объёмной доле 0,4% содержание экзосомодобных (100-нм) частиц в препарате 10^{12} /мл

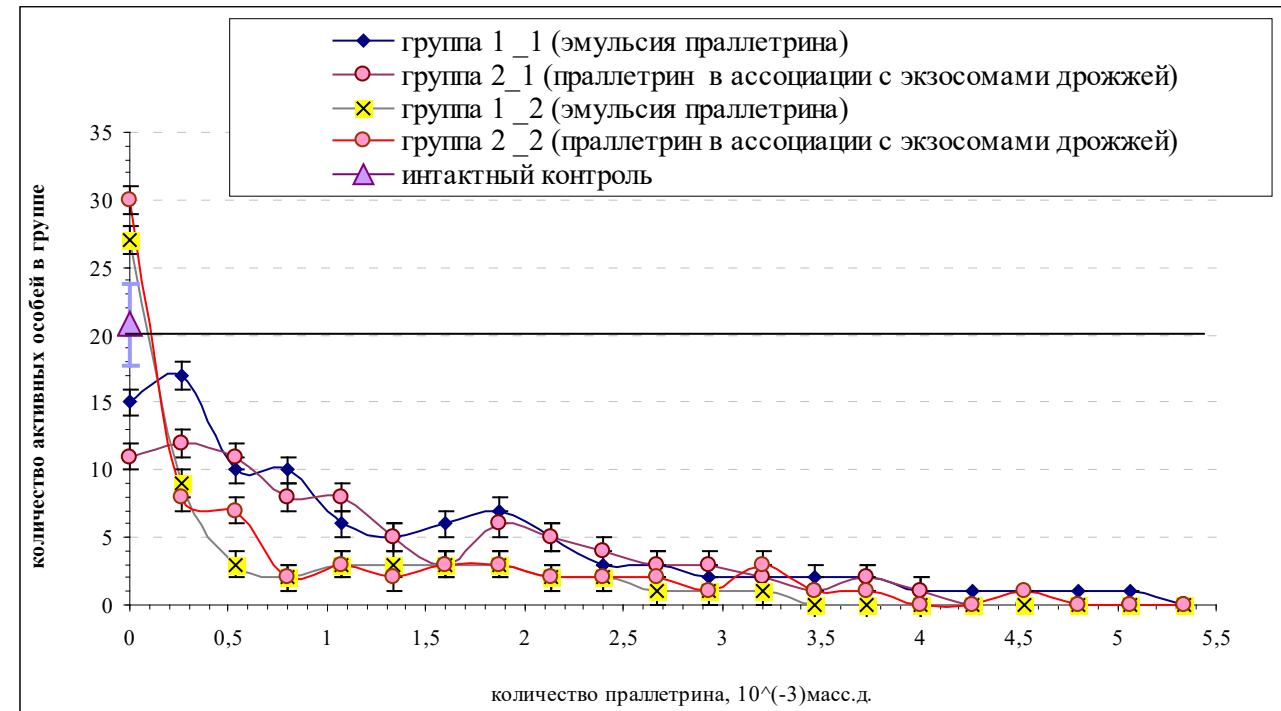
Материалы и методы

- В качестве опытных объектов, согласно принципами гуманных исследований *in vivo* RRR*, были выбраны опарыши (личинки мясной мухи *Sarcophagidae*). Модель церебрального барьера насекомых является наиболее близкой к позвоночным, отражая все ключевые транспортные процессы. Модельным препаратом был выбран праллетрин – инсектицид, блокирующий передачу возбуждения к нервным окончаниям насекомых, свободно доступный в продаже.
- Целью работы явилось сравнительное изучение биодоступности праллетрина в виде эффективности воздействия препарата в исходном виде и в ассоциации с экзосомами пивных дрожжей на активность опарышей – по двигательной активности личинок в виде ползания по вертикальной стеклянной стенке, угнетаемого праллетрином.
- Оцифровку данных производили подсчетом количества одновременно поднимающихся по стенкам особей, снижающимся с увеличением дозы препарата на дне сосуда.

*replacement, reduction, refinement

Опыты на опарышах (личинках мясных мух)

Сопоставление нейротоксического (депрессивного) эффекта праллетрина в свободной эмульсионной форме с формой в ассоциации с экзосомальной фракцией дрожжей



Три группы опарышей в количестве по 60 штук: контрольная группа, получающая воду с сахаром, группу препарата сравнения, получавшая 0,04% праллетрин, в виде эмульсии в сахарной воде, и группа, получавшая коллоидный раствор супернатанта жидкой культуры *Saccharomyces cerevisiae*, в которую предварительно введен 0,04% праллетрин. Группы сравнивались по количествам особей, способных ползать по вертикальной стеклянной стенке сосуда.

Общие выводы

1. Разработана и отработана удобная дозозависимая модель для испытания нейростимуляторов и депрессантов на личинках мясных мух, соответствующая концепции RRR (replacement, reduction, refinement).
2. Введение праллетрина в совокупности с экзосомами дрожжей после преинкубации с живой дрожжевой культурой достоверно не меняет активности угнетения двигательной активности опарышей.
3. Дрожжевые экзосомы не обладают токсичностью и не оказывают влияния на нервную активность.

(\Rightarrow Экзосомы пищи не влияют на фармакокинетику препаратов и процессы формирования памяти, по крайней мере, дрожжевые)

Общие результаты работы и выводы

1. На основании анализа данных научных статей, 1983-2020 гг, посвященных экзосомам, сформировано понимание об экзосомах как о функциональных единицах общения не только межклеточных компартментов, но и клеток внутри и между тканями организма. Экзосомы спонтанно синтезируются всеми живыми билипидными мембранами при наличии градиентов рН или ионной силы, - что является физико-химическим артефактом. В состав экзосом спонтанно попадают участки донорских мембран, включая специфические поверхностные белки, - что является ключом для адресного узнавания и пути метаболизма. Также внутрь экзосом спонтанно попадает примембранный объём цитоплазмы, включая все биологически активные вещества компартмента. Это делает экзосомы потенциально перспективным объектом диагностики, а также методом терапии.
2. Сформулирована гипотеза о нейрональных экзосомах как единицах формирования и хранения информации (памяти) в мозге, - в процессе последовательной передачи между всеми участниками соответствующего паттерна возбуждения. В результате обобщенные экзосомы памяти хранят информацию обо всех связанных участниках возбуждения в виде белкового кода тетраспанинов на своей поверхности, узнаются ими специфически и запускают ПД. Гипотеза полностью является новой.
3. Разработана и отработана удобная модель для доклинического тестирования нейротропных препаратов на опарышах, отвечающая концепции RRR (replacement, reduction, refinement)..
4. В результате экспериментов сделан вывод о качественной неэффективности межтаксономического использования экзосом дрожжей для улучшения биодоступности препаратов, в том числе для улучшения прохождения тканевые барьеры.

Спасибо за внимание!

Жду ваших вопросов и замечаний.

Для любопытных –
может последовать видео
проведённых экспериментов 😊

Эксперимент сравнительного исследования праллетрина на опарышах

